植物天然产物合成生物学研究

戴住波[1]　王　勇[2]　周志华[2]　李盛英[3]　张学礼[1*]

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308
2 中国科学院上海生命科学研究院 植物生理生态研究所 上海 200032
3 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 青岛 266101

摘要　植物天然产物在医药健康领域有着广泛的应用。从植物中直接提取是目前生产植物源天然产物的主要方法，但此法在环境、安全和效率等方面存在诸多问题。基于合成生物学的理念，创建人工细胞工厂发酵生产植物源天然产物是一种新的资源获取模式。文章将从研究路线出发，在萜类、苯丙素类和生物碱等化合物的生产应用案例中，介绍人工合成细胞生产植物源天然产物的研究现状。

关键词　植物天然产物，合成生物学，微生物细胞工厂，萜类

DOI　10.16418/j.issn.1000-3045.2018.11.011

植物能合成微量次生代谢物，进而发挥机体生物防御和信号传导作用。由于这些植物天然产物对人体有较强的生理活性，已被广泛应用于医药健康等领域。据中国社会科学院医药蓝皮书《中国药品市场报告（2012）》称，中国药品市场2012年总规模为9 261亿元人民币；预计到2020年，中国药品市场的规模将达到2.3万亿元人民币[1]。植物天然产物一直作为药物、保健品及化妆品的重要来源，如吗啡、青蒿素、麻黄素和紫杉醇等药效显著的药物均属于植物源药物；年销售额超过400亿美元的激素类药物，目前主要是以薯蓣皂素、番麻皂素和剑麻皂素等植物皂素为基础原料生产[2,3]。另外，植物天然产物在农药、兽药及其他与人类生活密切相关的工农业生产领域中也具有广泛的需求和应用，如黄连中的黄连素等生物碱类抗生素在畜牧养殖中的应用有良好安全性，已经成为理想的饲用抗生素替代品。与此同时，高品质的植物天然产物，如人参皂苷、玫瑰精油、番茄红素、花青素、新型甜味剂罗汉果苷和甜菊糖等，是人类化妆品、保健品和调味剂的主要原料，市场前景广阔[3]。

植物提取是目前植物天然产物的主要生产方式。这种传统生产模式有较多缺点，如天然产物含量低且差异大，植物生长周期长，类似物复杂导致产品纯化难，以及对生物资源尤其是野生植物资源造成严重破坏等[3-5]。随着市场需求的日益增大，野生名贵中药灵芝、人参、三七的原植物均已濒危或野外灭绝，目前的资源供给已

*通讯作者
资助项目：中国科学院青年创新促进会项目（2015138）
修改稿收到日期：2018年10月23日

经难以为继[3]。在化学合成方面，由于大部分天然产物结构复杂，具有较多的手性中心，合成过程中容易形成无活性甚至有毒的、难以分离的旋光异构体；而且合成过程步骤繁琐，转化率低，能耗高，所用有机溶剂易造成污染，难以满足工业化需求[3]。而植物组织细胞培养法操作较复杂、周期长，且由于生产成本过高，所以也不易实现工业化。相比较而言，利用酿酒酵母酿造啤酒的类似原理，通过发酵生产植物天然产物具有生产周期短、不受时节和原料供应的限制、发酵产物比较单一、易于分离纯化等优点，容易实现大规模工业化生产。

基于合成生物学的原理，设计和创建人工合成细胞发酵生产植物天然产物，既能有效控制原料供给，又能保护自然资源及环境，其作为一种绿色高效的新型生产模式已被科学界及工业界认可[3]。近年来，随着合成生物学的飞速发展，微生物合成植物源天然产物的种类不断增多，产量也在逐年攀升[6-8]。本文将从研究路线出发，在萜类、苯丙素类和生物碱等化合物的生产应用案例中介绍人工合成细胞生产植物源天然产物的研究现状。

1 植物天然产物合成生物学研究路线

在实现植物天然产物发酵法生产的过程中，特征基因元件挖掘与优化、生物合成途径优化和细胞工厂性能提升等组成了植物天然产物合成生物学研究的基本内容。

1.1 特征元件挖掘与优化

除启动子、终止子等主要控制基因表达的基因元件外，鉴定和优化植物天然产物生物合成途径中的关键基因元件是应用合成生物学技术革新天然产物生产方式的核心和源头。

植物天然产物生物合成途径的解析，目前主要采取基因组或转录组-异源重建的方法进行挖掘。近年来，基于基因测序技术和生物信息学的发展，吗啡[9-12]、甘草酸[13]、人参皂苷[5]、丹参酮[7,14]、葫芦素[15]、罗汉果苷[16]、依托泊苷[17]和长春花碱[18]等重要植物天然产物生物合成途径的解析取得突破。一批重要类型的基因功能元件被挖掘和鉴定，其中被称为“万能生物催化剂”的细胞色素P450酶的催化机制被深入研究[19-21]。然而，自然界中存在的有重要价值的植物天然产物（如青蒿素和吗啡等）就有上万种。由于各种制约因素，在这样一个相当丰富的群体中，只有极少数分子的生物合成过程机制得到解析。因此，开发高效、可靠和低成本的方法平台，进行规模化的植物天然产物合成途径的分子基础与过程机制解析，对植物天然产物这一自然宝库的系统保护和有效开发具有重要战略意义。

在功能元件优化方面，对于蛋白质晶体结构、催化机理较清晰的酶，可采用理性设计的方法。如基于纤维假丝酵母木糖还原酶（XR）的结构，对Lys274和Asn276等氨基酸位点进行了突变后，发现XR对辅因子NADPH的偏好性提高了170倍[3,22]。然而，来源于植物天然产物合成途径的功能酶类型复杂，绝大多数的晶体结构未得到解析。对这类酶的改造，目前一般是用随机突变等方法对正突变进行进一步富集，从而使酶的活性、热稳定性、对底物的亲和力和偏好性得到很大改善[3]。如利用随机突变的方法，对类球红细菌合成酶进行定向进化改造，使番茄红素工程菌株产量提高了近一倍[23]。

另外，通过功能酶融合和搭建蛋白质脚手架的方法，可使代谢途径中各个酶形成可控的复合体，提高底物的有效浓度，降低毒性中间体的积累，从而达到提高底物转化率的效果[3]。如融合酿酒酵母内源的法尼基焦磷酸合成酶及牻牛儿牻牛儿基焦磷酸合成酶，可显著提高酿酒酵母牻牛儿牻牛儿基焦磷酸的合成能力[7]；通过搭建蛋白质手脚架的方法，优化甲羟戊酸的3个合成酶的比例和空间布局来提高产物生成量，同时降低细胞负荷，最终甲羟戊酸的浓度提高了77倍[24]。

1.2 生物合成途径优化

利用基因元件在宿主细胞中进行异源生物合成途径的重建，一般需要考虑多种影响途径合成效率的因素，例如：物质和能量的平衡，异源代谢产物对宿主细胞生

理性能的影响（毒性），异源代谢产物、功能酶、生物途径及宿主细胞之间的兼容性等多个方面。目前，国内外已经开发出一些优化生物合成途径的策略。

（1）物质流分配控制。通过调控关键节点基因的表达来控制目标化合物在物质流供给网络中的分配比例。如在青蒿酸工程菌构建过程中，通过提高生物合成途径上游基因的表达来增加前体供给和抑制分支途径基因的表达来减少底物竞争物质流控制方案，显著提高了工程菌株发酵生产青蒿酸的能力[3,25]。

（2）合成途径的精确控制。通过建立启动子文库来精确控制基因的表达量，使合成途径中各基因协调表达，减少中间代谢产物积累，降低细胞负荷，最终提高工程菌株的发酵生产性能[3]。如利用不同强度的启动子对脂肪酸合成途径和异源的桦木酸合成途径进行协同表达，发现工程菌株桦木酸的产量可在 200 倍范围内变化[26]。

（3）合成途径的动态控制。微生物合成途径优化中极为重要的一环是对途径中各代谢物进行动态定量和监测。依靠对目标代谢物的特异敏感性，生物传感器（biosensor）可将代谢物的变化信息通过多种信号实时输出，实现动态监测和反馈。基于此特性，生物传感器可以应用于构建动态代谢物调节回路，增加目标化合物的产量[3]。如，利用可以响应丙酰辅酶 A 的生物传感器监测胞内丙酰辅酶 A 的积累，从而反馈下调乙酰辅酶 A 羧化酶的表达来降低细胞毒性[27]；利用 RNA 微矩阵方法鉴定出的法尼基焦磷酸生物传感器可用于平衡代谢流，增加紫槐二烯的产量[28]。

1.3 细胞工厂性能提升

细胞工厂综合效率的提高受很多因素影响，包括高效的原料利用率、产物的储存能力、优秀的发酵性能等多个方面。近期科学家们在亚细胞区室利用、产物储存、酶载体和菌株抗污染等方面发展了新的策略。

（1）细胞器空间的充分利用。细胞中的线粒体、高尔基体、内质网等细胞器能为生物反应提供催化环境。例如，利用导肽将法尼基焦磷酸合酶和瓦伦烯合酶定位到酵母细胞器线粒体中，可以增加工程菌天然香精瓦伦烯的合成[29]；通过将吗啡生物合成途径中相关酶的 C 端锚定至内质网，可以增加吗啡的生成率[30]。

（2）细胞膜工程。植物天然产物中有相当部分是疏水化合物，它们一般会滞留在细胞中，但由于细胞空间有限，从而影响目标产物的生产。中国科学院天津工业生物技术研究所的科学家近期研究了大肠杆菌细胞膜改造对提高萜类化合物合成能力的影响。研究结果显示，调控与细胞膜合成相关基因，能使细胞的膜量增加并向内堆积，从而显著提高用于存储 β- 胡萝卜素的空间，增加了工程菌中 β- 胡萝卜素产量[31]。

（3）内质网工程。为功能酶提供更多的催化场地是近期发展的一种新方法，如通过敲除酿酒酵母的 *PHA1* 基因来提高酵母中内质网的含量，极大地增大了定位于内质网膜的细胞色素 P450 酶的附着空间，提高了酶的含量和催化产物的产量[32]。

（4）非典型营养物质利用。在工程菌大规模发酵生产过程中，杂菌的污染较常见，严重影响生产效率。Novogy 公司和美国麻省理工学院的科学家首先改造酿酒酵母、解脂耶氏酵母和大肠杆菌等微生物营养元素的利用途径，通过在发酵过程中使用杂菌不能利用的营养元素建立发酵工艺，能显著提高工程微生物细胞的抗污染能力[33]。

2 研究案例

近 10 年来，植物天然产物的合成生物学领域研究发展迅速。萜类、苯丙素类和生物碱等系列植物天然产物的人工合成细胞工厂被成功创建。

抗疟一线药物青蒿素，是由 20 世纪 70 年代中国中医科学院中药研究所屠呦呦及其研究团队在我国传统中草药青蒿中发现的一种倍半萜类化合物[3]。过去的生产方式为，从黄花蒿中直接提取。美国加州大学伯克利分校的科学家历时 10 年，实现了利用酵母细胞工厂发酵生产青蒿

酸，并开发了经简单化学反应合成青蒿素的工艺[6]。经计算，其在不到 100 m^3 发酵车间中年产青蒿素能达到 35 t，相当于我国近 5 万亩耕地的种植产量。该项工作被认为是利用人工合成细胞生产植物萜类天然产物研究领域的里程碑工作[3]。

在镇痛药物的生产方面，美国斯坦福大学的科学家结合功能元件挖掘和优化、合成途径构建及优化等手段，将一系列细菌、植物、动物以及酵母来源的功能基因导入酵母中，实现了发酵法生产吗啡等阿片类生物碱的突破[34]。

在抗癌药物的生产方面，美国麻省理工学院的研究团队在大肠杆菌中引入了二萜抗癌药物紫杉醇生物合成的紫杉二烯合成酶，并对上游 *MEP* 功能模块及下游萜类合成功能模块进行精确调控，最终获得了产量达 1 g/L 的紫杉二烯的细胞工厂[35]。

在俗称“脑黄金”的 DHA 和 EPA 等长链脂肪酸生产方面，杜邦公司的研发人员在脂肪酸含量可占 40% 细胞干重的解脂耶氏酵母中引入 21 个编码 5 种不同酶的外源基因，工程菌株可生产占 15% 细胞干重的长链脂肪酸 EPA[36]。

我国在植物天然产物人工合成细胞的研究领域有很好的工作基础。建立了一整套植物天然产物合成生物学生产的技术体系，包括植物天然产物基因元件挖掘技术、高通量自动化克隆技术、合成途径创建与精确调控技术、发酵与分离提取技术。也创建了包括 β- 榄香烯、类胡萝卜素、人参皂苷、天麻素、甜菊糖苷、三萜酸、红景天苷、罗汉果甜苷、灯盏乙素等一系列植物天然产物的人工合成细胞，详述如下。

2.1 萜类

萜类化合物广泛存在于自然界中，目前已超过 5 万种的萜类化合物被发现，其中大部分是药用植物中的有效成分[37]。青蒿素、抗癌药物紫杉醇、具有保健作用的人参皂苷及作为抗氧化剂的类胡萝卜素类化合物均属于萜类[3]。

2.1.1 萜类香精

全球香精香料市场广阔，檀香醇、广藿香醇、橙花叔醇、β- 榄香烯等萜类精油广泛应用于日化品、食品和药品等领域。其中，β- 榄香烯是从姜科植物温郁金、莪术等药用植物中提取的国家一类抗癌药物的有效成分。天然来源的 β- 榄香烯含量低、化学类似物组成复杂等原因，导致其分离成本过高。中国科学院天津工业生物技术研究所与中国中医科学院中药资源中心合作，利用代谢工程与合成生物学技术提高酿酒酵母中萜类的生物合成通量和产物兼容性。在此基础上，进行吉玛烯 A 合成酶的蛋白质工程改造和高产吉玛烯 A 工程菌创建，并成功开发吉玛烯 A 热转化为 β- 榄香烯的耦合工艺，最终将高纯度 β- 榄香烯获得成本降为植物提取的 0.15%[38]。

2.1.2 丹参酮

近几年来，我国在丹参酮人工合成细胞研究领域取得了重要进展。丹参酮属于松香烷型二萜化合物，是我国传统中药丹参的主要有效成分，具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种活性。中国中医科学院中药资源中心与中国科学院大连化学物理研究所、美国爱荷华州立大学、中国科学院遗传与发育生物学研究所、中国科学院上海辰山植物科学研究中心、中国科学院天津工业生物技术研究所等研究单位合作，发现了催化生成丹参酮基本骨架——次丹参酮二烯的两个功能酶[39]，构建了高产次丹参酮二烯的酵母工程菌株[7,40]。进而利用 C-13 同位素标记技术，确定了该碳骨架结构在丹参酮生物合成中的作用。在此基础上，又发现了催化次丹参酮二烯生成代谢中间产物铁锈醇的关键酶基因 *CYP76AH1*，并构建了高产铁锈醇的酵母工程菌[14]。之后又进一步发现了催化 C-7、C-11 和 C-20 位点的 *P450* 基因，获得了能同时产生多种丹参酮类化合物的酵母工程菌[41]。

2.1.3 甜菊糖

甜菊糖是下一代重要的健康天然甜味剂。中国科学院上海植物生理生态研究所通过构建甜叶菊功能基因数据库，对甜菊糖生物合成途径的关键酶进行了充分挖

掘。成功鉴定了甜菊糖生物合成途径中的关键酶，并在大肠杆菌底盘细胞中重构了从头合成甜菊糖苷类化合物的非天然合成途径。经一系列理性设计和优化，使大肠杆菌中甜菊糖生物合成的关键中间体产量得到大幅度提高，并成功地获得了其主要组分RA[42]。在此基础上，该团队又解析了甜叶悬钩子与明日叶中甜茶素的生物合成过程，报道了6条新的二萜糖基转移酶，并对其底物识别的机制进行了研究。通过不同物种来源的糖基转移酶的正交组合，在微生物细胞中实现了甜茶素的高效全细胞转化[43]。该研究为实现重要二萜类糖苷化合物的合成生物制造奠定了基础，同时为改造大肠杆菌成为复杂萜类化合物异源合成的底盘细胞提供了成功范例。

2.1.4 人参皂苷

人参皂苷是名贵中药人参和西洋参的有效成分，是原人参二醇、原人参三醇和齐墩果酸三类苷元在糖基转移酶的催化下形成的系列混合物的总称，具有抗肿瘤[44,45]、降血糖[46]、促免疫等功能。中国科学院天津工业生物技术研究所与中国中医科学院中药资源中心合作，在酿酒酵母中首次成功构建原人参二醇的生物合成途径，并且发现鲨烯环氧酶在控制三萜化合物的生物合成中起关键作用[3]。在此基础上，通过提高关键基因的表达活性，将原人参二醇的产量提高了262倍。再通过双相发酵工艺优化，最终将原人参二醇的产量提高至1 g/L[47]。近期，合作团队公开报道了将细胞工厂三萜合成通量提高到10 g/L级别的构建方案，创建出产量能达到15 g/L人参皂苷前体的高效酵母细胞工厂[48]。另外，将齐墩果酸、原人参二醇和原人参三醇这3个功能模块导入同一底盘细胞，获得能同时合成3种人参基本皂苷元的第一代基于多组分概念的“人参酵母”细胞工厂[49]。

中国科学院上海植物生理生态研究所与中国科学院上海药物研究所合作，首先从人参中克隆和鉴定了合成稀有人参皂苷CK、Rh2、Rg3、Rh1和F1所需要关键糖基转移酶和P450还原酶PgCPR1。在此基础上通过细胞工厂的构建和优化，实现了利用单糖发酵生产稀有人参皂苷CK、Rh2、Rg3、Rh1和F1的工艺，目前产量均超过2 g/L[5,50,51]。近期该团队又从人参和三七中进一步挖掘了20多个糖基转移酶，较全面解析了人参和三七皂苷的生物合成途径。相关糖基转移酶的专利已经进入6个国家和地区进行审查，其中在中国和日本已经获得授权（PCT/CN2013/088819）。

2.1.5 三萜酸类

苹果、山楂、枇杷、枣和梨等水果表皮蜡质中含有微量的高值三萜酸类活性成分，包括科罗索酸、山楂酸、麦珠子酸和积雪草酸等化合物。它们在抗病毒[52]、糖尿病控制[53]和皮肤修复[54]等方面有广泛用途，是一类重要的膳食补充剂。其中，科罗索酸在抗糖尿病方面有显著作用[53]，被认为是一种天然植物胰岛素。从原植物中直接提取是目前生产这类化合物的主要方式。为了创建高效微生物细胞工厂实现这类药效化合物的发酵法生产，中国科学院天津工业生物技术研究所研究团队开发了“即插即用”生物合成途径快速解析平台，包括植物组织培养、差异转录组测序分析和代谢物分析、候选基因在底盘细胞中的表征及化合物鉴定。利用这一平台，团队从药用植物山楂P450库中首次筛选到能催化齐墩果酸和乌索酸生成2位α-羟化产物山楂酸和科罗索酸的功能P450酶MAA45。在此基础上，创建出高效生产山楂酸和科罗索酸的酿酒酵母细胞工厂，产量分别达384 mg/L和141 mg/L[55,56]。

2.1.6 类胡萝卜素

类胡萝卜素在医药、营养品、化妆品以及食品领域具有重要用途。β-胡萝卜素、番茄红素、虾青素是代表性的类胡萝卜素。中国科学院天津工业生物技术研究所以类胡萝卜素为研究对象，从物质代谢调控、能量代谢调控和细胞生理调控这3个方面开展研究，较为系统地解析了微生物高效合成萜类化合物的调控机制[57,58]。①在物质代谢方面，发现IspG和IspH是重要的限速步骤，并且这两个酶需要协同表达才能发挥作用。IspG的单独过表达会导致有毒中间代谢物HMBPP积累，严重

抑制细胞生长代谢[58]。② *在能量代谢方面*，通过对中央代谢途径（磷酸戊糖和 TCA）的多尺度模块化调控，发现 TCA 途径的代谢通量是大肠杆菌好氧合成 NADPH 的最主要限制因素，解决了萜类化合物合成代谢中的还原力不平衡问题[57]。③ *在细胞生理调控方面*，系统研究了大肠杆菌细胞膜存储能力的限制因素，发现细胞膜形态和细胞膜组分合成能力是制约大肠杆菌细胞膜存储能力的关键因素。引入外源的膜折叠蛋白，能改变大肠杆菌的细胞膜形态，形成细胞膜向内的褶皱。增强甘油磷脂合成能力可以进一步增加细胞膜向内的褶皱，从而进一步增强细胞膜存储能力并显著提高萜类化合物的产量[31]。在此基础上，构建出一系列高效生产类胡萝卜素的微生物细胞工厂。在 200 L 发酵罐中完成了番茄红素的中试验证，发酵 48 小时，番茄红素产量达 7 g/L。

2.2 苯丙素等莽草酸途径来源产物

苯丙素是天然存在的一类苯环与 3 个直链碳连接构成的化合物，如花青素、白藜芦醇和咖啡酸等。它们主要在抗氧化作用、心血管保健、抗病毒和凝血等方面有显著药理活性。这些化合物的发酵法生产最近也有新的突破，其中 Evolva 公司研发的白藜芦醇生产技术已经进入产业化阶段。我国科学家在天麻素、灯盏乙素、红景天苷和丹参素等方面有突破性进展。

2.2.1 天麻素

天麻是我国名贵中药材之一，天麻素作为天麻的主要活性成分，临床上广泛应用于神经衰弱及神经衰弱综合征的治疗。然而天麻资源本身珍稀，且其天麻素含量低（仅为 0.4%），因而天麻素的植物提取价格昂贵。另外，化学合成方法存在成本较高和污染严重等缺点；植物中天麻素的生物合成通路至今还未解析清楚。因而，中国科学院天津工业生物技术研究所团队以大肠杆菌莽草酸通路的分支酸为前体，通过过表达来源于大肠杆菌、诺卡氏菌和枯草芽孢杆菌的关键基因，并引入植物红景天来源的糖基转移酶 UGT73B6，在国际上首次创建了天麻素大肠杆菌合成通路。通过进一步调控莽草酸通路、UDP- 葡萄糖通路、NADPH 还原力，对糖基转移酶进行突变和筛选，发酵条件优化，显著提高了天麻素产量。目前，以葡萄糖为原料的天麻素生产成本预计在 500 元/kg 以下，仅为植物提取的 1/200，化学合成的 1/2[59]。近期，中国科学院青岛生物能源与过程研究所和湖南师范大学合作，利用芳烃前体 4- 甲酚的氧化降解途径进行了生物转化法生产天麻素的研究。目前，在摇瓶中投入 5 mmol/L 4- 甲酚前体时，天麻素产量能达到 433.3 mg/L[20,21,60]。

2.2.2 灯盏乙素

灯盏花药品是治疗心脑血管疾病的必备药品，在中国心脑血管领域中灯盏花制剂产品已经占据了约 7% 的市场份额。中国科学院天津工业生物技术研究所与云南农业大学合作，利用合成生物学和生物信息学技术，成功从灯盏花基因组中鉴定到灯盏乙素生物合成途径中的关键基因，并在酿酒酵母底盘中成功构建了灯盏乙素合成的细胞工厂。通过代谢工程改造与发酵工艺优化，目前细胞工厂生产的灯盏乙素含量已达到百毫克级[61]。

2.2.3 丹参素

丹参素是来源于丹参的多酚类药物，天津大学利用丹参素与细胞自身代谢产物对羟苯基丙酮酸的相似性，创建了全新的人工替代生物合成途径；并理性改造人工元件乳酸脱氢酶和羟化酶，提升与非天然底物的特异性，实现了微生物细胞工厂高效合成丹参素，发酵产量达 7 g/L[62]。

2.2.4 红景天苷

红景天苷是一种极具开发前景的环境适应药物。红景天生长于高寒环境，资源匮乏，不易种植，药用组分含量低，且含有有毒物质杂质。中国科学院天津工业生物技术研究所团队利用莽草酸通路在大肠杆菌中构建了红景天苷的合成通路，通过酶的定向进化和代谢调控等工作，获得一个高产红景天苷的工程菌。经过进一步的发酵条件优化，目前大肠杆菌生产红景天的成本仅是植物提取成本的 1/40 [59]。

3 展望

近年来，基于合成生物学原理设计人工合成细胞工厂发酵生产植物源天然产物的研究，已经取得了一系列坚定领域发展信心的成绩，如青蒿素、β-榄香烯、番茄红素、人参皂苷及吗啡等细胞工厂的成功创建[3]。相比传统生产方式，这种新的资源获取策略在资源可持续利用和经济效益等方面均具有很显著的优势，因而作为一种革新模式崭露头角。

据统计，仅我国就有上万种含有生物活性成分的药用植物（中药），它们为现代药物开发提供了靶点丰富的前体药物宝库，同时其丰富的生物合成途径为我们提供了催化类型多样的天然酶库。然而“双宝库”的有效开发是高度交叉的前沿研究领域，需要集生物学、信息学、化学、中药学、药学等多种学科的共同努力和协作攻关。

具体到理论和技术方面的现状，目前生物合成途径的规模化解析和元件库建设、生物途径高通量组装和优化、人造系统的调试等方面还处于初级发展阶段，人工智能等自动化技术参与程度较低。一些化合物类型的研究基础薄弱，工程细胞异源合成效率还比较低，导致发酵法成本与传统路线相比经济优势不明显，需要进一步加强攻关。但总的来说，随着人工智能技术的逐渐成熟，植物基因组的测序技术低成本化，高通量化学合成基因技术的完善，以及全局代谢网络为基础的代谢途径优化理念和操作的进一步突破等，最终人们将真正迎来植物源天然产物人工合成的新时代。

参考文献

1 程锦锥, 朱恒鹏. 中国药品市场报告. 北京: 社会科学文献出版社, 2012.

2 刘夺, 张莹, 周晓, 等. 合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望. 生命科学, 2013(10): 958-965.

3 王冬, 戴住波, 张学礼. 酵母人工合成细胞生产植物源天然产物. 微生物学报, 2016, 56(3): 516-529.

4 Kuboyama T, Yokoshima S, Tokuyama H, et al. Stereocontrolled total synthesis of (+)-vincristine. PNAS, 2004, 101(33): 11966-11970.

5 Wang P P, Wei Y J, Fan Y, et al. Production of bioactive ginsenosides Rh2 and Rg3 by metabolically engineered yeasts. Metabolic Engineering, 2015, 29: 97-105.

6 Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. Nature, 2013, 496(7446): 528-529.

7 Dai Z B, Liu Y, Huang L Q, et al. Production of miltiradiene by metabolically engineered Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(11): 2845-2853.

8 Xie W P, Lv X M, Ye L D, et al. Construction of lycopene-overproducing Saccharomyces cerevisiae by combining directed evolution and metabolic engineering. Metabolic Engineering, 2015, 30: 69-78.

9 DeLoache W C, Russ Z N, Narcross L, et al. An enzyme-coupled biosensor enables (S)-reticuline production in yeast from glucose. Nature Chemical Biology, 2015, 11(7): 465-471.

10 Farrow S C, Hagel J M, Beaudoin G A W, et al. Stereochemical inversion of (S)-reticuline by a cytochrome P450 fusion in opium poppy. Nature Chemical Biology, 2015, 11(9): 728-732.

11 Fossati E, Narcross L, Ekins A, et al. Synthesis of Morphinan Alkaloids in Saccharomyces cerevisiae. PLoS One, 2015, 10(4): 15.

12 Winzer T, Kern M, King A J, et al. Morphinan biosynthesis in opium poppy requires a P450-oxidoreductase fusion protein. Science, 2015, 349(6245): 309-312.

13 Zhu M, Wang C, Sun W, et al. Boosting 11-oxo-β-amyrin and glycyrrhetinic acid synthesis in Saccharomyces cerevisiae via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants. Metabolic Engineering, 2017, 45: 43.

14 Guo J, Zhou Y J, Hillwig M L, et al. CYP76AH1 catalyzes

turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. PNAS, 2013, 110(29): 12108-12113.

15 Shang Y, Ma Y S, Zhou Y, et al. Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. Science, 2014, 346(6213): 1084-1088.

16 Itkin M, Davidovich-Rikanati R, Cohen S, et al. The biosynthetic pathway of the nonsugar, high-intensity sweetener mogroside V from *Siraitia grosvenorii*. PNAS, 2016, 113(47): 7619-7628.

17 Lau W, Sattely E S. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone. Science, 2015, 349(6253): 1224-1228.

18 Caputi L, Franke J, Farrow S C, et al. Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in Madagascar periwinkle. Science, 360(6394): 1235-1239.

19 Zhang X, Li S. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. Natural Product Reports, 2017, 34(9): 1061-1089.

20 Du L, Ma L, Qi F, et al. Characterization of a unique pathway for 4-cresol catabolism initiated by phosphorylation in corynebacterium glutamicum. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(12): 6583-6594.

21 Du L, Dong S, Zhang X, et al. Selective oxidation of aliphatic C-H bonds in alkylphenols by a chemomimetic biocatalytic system. PNAS, 2017, 114(26): 5129-5137.

22 Petschacher B, Nidetzky B. Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of Saccharomyces cerevisiae. Microbial Cell Factories, 2008, 7: 12.

23 Wang C W, Liao J C. Alteration of product specificity of Rhodobacter sphaeroides phytoene desaturase by directed evolution. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(44): 41161-41164.

24 Dueber J E, Wu G C, Malmirchegini G R, et al. Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. Nature Biotechnology, 2009, 27(8): 753-U107.

25 Lenihan J R, Tsuruta H, Diola D, et al. Developing an industrial artemisinic acid fermentation process to support the cost-effective production of antimalarial artemisinin-based combination therapies. Biotechnology Progress, 2008, 24(5): 1026-1032.

26 Li J, Zhang Y S. Increase of betulinic acid production in Saccharomyces cerevisiae by balancing fatty acids and betulinic acid forming pathways. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(7): 3081-3089.

27 Liu D, Xiao Y, Evans B S, et al. Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor-actuator. Acs Synthetic Biology, 2015, 4(2): 132-140.

28 Xu P, Wang W, Li L, et al. Design and kinetic analysis of a hybrid promoter-regulator system for malonyl-coa sensing in *Escherichia coli*. ACS Chemical Biology, 2014, 9(2): 451-458.

29 Farhi M, Marhevka E, Masci T, et al. Harnessing yeast subcellular compartments for the production of plant terpenoids. Metabolic Engineering, 2011, 13(5): 474-481.

30 Thodey K, Galanie S, Smolke C D. A microbial biomanufacturing platform for natural and semisynthetic opioids. Nature Chemical Biology, 2014, 10(10): 837-844.

31 Wu T, Ye L, Zhao D, et al. Membrane engineering - A novel strategy to enhance the production and accumulation of beta-carotene in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2017, 43(Pt A): 85-91.

32 Arendt P, Miettinen K, Pollier J, et al. An endoplasmic reticulum-engineered yeast platform for overproduction of triterpenoids. Metabolic Engineering, 2017, 40: 165-175.

33 Shaw A J, Lam F H, Hamilton M, et al. Metabolic engineering of microbial competitive advantage for industrial fermentation processes. Science, 2016, 353(6299): 583-586.

34 Galanie S, Thodey K, Trenchard I J, et al. Complete biosynthesis of opioids in yeast. Science, 2015, 349(6252): 1095-1100.

35 Ajikumar P K, Xiao W-H, Tyo K E J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. Science, 2010, 330(6000): 70-74.

36 Xue Z, Sharpe P L, Hong S P, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 734-740.

37 Chang M C Y, Eachus R A, Trieu W, et al. Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. Nature Chemical Biology, 2007, 3(5): 274-277.

38 张学礼, 黄璐琦, 戴住波, 等. 一种重组菌及其用途: 中国, PCT/CN2017/109029P. 2017-11-02.

39 Gao W, Hillwig M L, Huang L, et al. A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights. Organic Letters, 2009, 11(22): 5170-5173.

40 Zhou Y J, Gao W, Rong Q, et al. Modular pathway engineering of diterpenoid synthases and the mevalonic acid pathway for miltiradiene production. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(6): 3234-3241.

41 Ulschan S, Wolfgang B, Andrea P, et al. Elucidation of the biosynthesis of carnosic acid and its reconstitution in yeast. Nature Communications, 2016, 7: 12942.

42 Wang J, Li S, Xiong Z, et al. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for de novo biosynthesis of steviolglycosides sweetener in *Escherichia coli*. Cell Research, 2016, 26(2): 258-261.

43 Sun Y, Chen Z, Li J, et al. Diterpenoid UDP-Glycosyltransferases from Chinese sweet tea and ashitaba complete the biosynthesis of rubusoside. Mol Plant, 2018, 11(10): 1308-1311.

44 Lee S J, Ji S L, Lee E, et al. The ginsenoside metabolite compound K inhibits hormone-independent breast cancer through downregulation of cyclin D1. Journal of Functional Foods, 2018, 46: 159-166.

45 Liao L M, Zhang Y, Lin S F, et al. Enzymatic transformation from protopanaxadiol ginsenoside Rb1 into rare ginsenoside C-K and its anti-cancer activity. Advanced Materials Research, 2013, 641-642: 752-755.

46 Lee K T, Jung T W, Lee H J, et al. The antidiabetic effect of ginsenoside Rb2 via activation of AMPK. Archives of Pharmacal Research, 2011, 34(7): 1201-1208.

47 Dai Z, Liu Y, Zhang X, et al. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for production of ginsenosides. Metabolic Engineering, 2013, 20(5): 146-156.

48 王冬, 刘怡, 许骄阳, 等. 创建酿酒酵母细胞工厂高效生产人参皂苷前体达玛烯二醇Ⅱ. 药学学报, 2018, 53(8): 1233-1241.

49 Dai Z, Wang B, Liu Y, et al. Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast. Scientific Reports, 2014, 4(3698): 3698.

50 Yan X, Fan Y, Wei W, et al. Production of bioactive ginsenoside compound K in metabolically engineered yeast. Cell Research, 2014, 24(6): 770-773.

51 Pingping, Wang, Yongjun, et al. Characterization of panax ginseng UDP- Glycosyltransferases catalyzing protopanaxatriol and biosyntheses of bioactive ginsenosides F1 and Rhl in metabolically engineered yeasts. Molecular Plant, 2015, 8(9): 1412-1424.

52 Xue B, Zhang Y I, Jiang H, et al. Effects of maslinic acid on the proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells. Molecular Medicine Reports, 2016, 13(1): 117-122.

53 Miura T, Ueda N, Yamada K, et al. Antidiabetic effects of corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(3): 585-587.

54 Bonte F, Dumas M, Chaudagne C, et al. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. Planta Medica, 1994, 60(2): 133-135.

55 张学礼, 戴住波, 刘芸, 等. 三萜2位α-羟化酶MAA45及其相关生物材料与它们在制备山楂酸和科罗索酸中的应用: 中国, CN201610236283.9. 2016-04-14.

56 Dai Z , Liu Y , Sun Z, et al. Identification of a novel cytochrome P450 enzyme that catalyzes the C-2α hydroxylation of pentacyclic triterpenoids and its application in yeast cell factories. Metabolic

Engineering. 2019, 51: 70-78.
57 Zhao J, Li Q, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β-carotene production. Metabolic Engineering, 2013, 17(17): 42-50.
58 Li Q, Fan F, Gao X, et al. Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2017, 44: 13-21.
59 Bai Y, Yin H, Bi H, et al. De novo biosynthesis of gastrodin in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2016, 35: 138-147.
60 钟贝芬, 杜磊, 李众, 等. 基于细胞色素P450单加氧酶介导的4-甲酚氧化降解途径的天麻素生物合成. 湖南师范大学自然科学学报, 2018, 41(4): 33-40.
61 Liu X, Cheng J, Zhang G, et al. Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. Nature Communications, 2018, 9(1): 448.
62 Yao Y F, Wang C S, Qiao J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway. Metabolic Engineering, 2013, 19(5): 79-87.

Synthetic Biology for Production of Plant-derived Natural Products

DAI Zhubo[1] WANG Yong[2] ZHOU Zhihua[2] LI Shengying[3] ZHANG Xueli[1*]
(1 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China;
2 Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China;
3 Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract Plant-derived natural products (PNPs) have been widely used in pharmaceutical and neutracuetical fields. Currently, extracting PNPs from their original plants is the main method to produce them. However, this extracting method is environmentally unfriendly, unsafe, and inefficient. Based on synthetic biology, construction of artificial cell factories for production of PNPs provides an alternative way. In this review, we focus on research progress for microbial production of terpenoids, alkaloids, and phenylpropanoids to give a brief introduction of construction of artificial cell factories for production of PNPs.

Keywords plant-derived natural products, synthetic biology, cell factories, terpenoids



戴住波 中国科学院天津工业生物技术研究所副研究员，中国科学院青年促进会会员。主要从事分子生药学和合成生物学等前沿交叉学科研究，以“人参酵母”和“精油酵母”等系列人工细胞工厂创建为研究案例，初步建立了以高效微生物细胞工厂为基础的天然药物和营养品绿色生产模式。研究成果发表在*Biotechnology and Bioengineering*、*Metabolic Engineering*等学术期上，申请专利12项（含PCT 1项），获中国药学会科学技术奖一等奖1项。
E-mail: dai_zb@tib.cas.cn

DAI Zhubo Associate Professor in Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences (TIB, CAS). His research interest is using synthetic biology and metabolic engineering to construct efficient yeast cell factories for production

*Corresponding author

of high-value plant metabolites from renewable biomass. Dr. Dai received his Ph.D. in molecular pharmacognosy at Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences in 2010. So far, he has published papers in *Biotechnology and Bioengineering*, *Metabolic Engineering*, and so on, and has applied 12 Chinese patents with 3 granted. E-mail: dai_zb@tib.cas.cn



张学礼 中国科学院天津工业生物技术研究所研究员，中国科学院系统微生物工程重点实验室主任。国家“万人计划”领军人才，国家自然科学基金优秀青年基金获得者，中国科学院“百人计划”专家。主要研究方向为应用微生物代谢工程及合成生物学技术构建高效微生物细胞工厂、生产大宗化学品和植物天然产物。成功构建了生产L-丙氨酸、丁二酸、D-乳酸、番茄红素、β-榄香烯等化学品的高效微生物细胞工厂。发表SCI论文50余篇，被引1600余次。获授权国外专利11项和中国专利13项。获中国专利优秀奖1项、安徽省科技进步奖二等奖1项、中国石油和化工联合会科技进步奖二等奖1项。E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn

ZHANG Xueli Professor in Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences (TIB, CAS), Director of the CAS Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology. He was supported by the Ten Thousand Talents Program, the Excellent Young Scientists Fund of National Natural Science Foundation of China (NSFC) and Hundred Talents Program of CAS. Dr. Zhang got his Bachelor's degree (2000) in biotechnology and Ph.D. degree (2005) in biochemistry and molecular biology at Shanghai Jiao Tong University. He did his postdoctoral research at University of Florida with training in metabolic engineering from 2005 to 2007, then he worked as a research assistant professor until 2009. In 2010, Dr. Zhang joined TIB as a professor. His current research interests are metabolic engineering and synthetic biology with applications in constructing microbial cell factories for production of bulk chemicals and plant-derived natural products (PNPs). He has published more than 50 SCI indexed papers, which have been cited about 1600 times. He has 24 issued patents in China, US, Europe, Canada, Japan, South Korean, Australia, and so on. He has obtained an Excellence Award for Chinese Patent and a Second Prize of The Scientific and Technological Progress of Anhui Province. E-mail: zhang_xl@tib.cas.cn

■责任编辑： 文彦杰